

Isolasi dan Karakterisasi L-Glutaminase dari Bakteri Simbion Spons dan Aplikasinya sebagai Antimikroba

Nurul Febriani Putri, Seniwati, Hasnah Natsir

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin Makassar

Kampus Tamalanrea Makassar 90245

nurulsyahrulchemist@yahoo.com

ABSTRACT

Enzyme from microbial symbionts sponge is bioactive compound that have potential as a new drug. This study aims to determine the antimicrobial potential of L-Glutaminase from bacterial symbiont sponge collected from Barang Lompo Island, South Sulawesi. The potential of antimicrobial activity from microbial symbionts sponge was performed using the agar diffusion method. Identification of microbial symbiont sponge producing L-Glutaminase and the greatest antimicrobial activity through Gram staining and biochemical test. L-Glutaminase were isolated from selected microbial symbiont sponge using ammonium sulfate fractionation method at saturation level of 0-40 %, 40-60 %, and 60-80 %. L-Glutaminase was purified by a dialysis method using a cellophane membrane. Test antimicrobial activity with agar diffusion method using paper discs. The biochemical test and Gram staining results that the microbial symbiont sponge producing L-Glutaminase and greatest antimicrobial activity have characteristics that lead to Klebsiella spp which is a Gram-negative bacteria.. L-Glutaminase produced the greatest activity at 72 hours of 25,74 U/mL with concentration optimum of L-Glutamin are 0,015 µg/mL, at 37 °C and pH 7. L-Glutaminase were isolated from Klebsiella spp DG4(3) have inhibitory effect on the growth of pathogenic bacteria such as Staphylococcus aureus and Escherichia coli. 40-60 % fraction having the largest inhibitory against Staphylococcus aureus of 10,8 mm (strong) and against Escherichia coli of 8,6 mm (medium) after 2 x 24 hours of incubation.

Keywords: Antimicrobial, Klebsiella spp., L-Glutaminase, Sponge

A. PENDAHULUAN

Bakteri patogen masih sering menjadi masalah dalam dunia kesehatan karena menyebabkan banyak penyakit. Untuk mengatasi berbagai penyakit yang diakibatkan bakteri patogen biasanya digunakan bahan kimia yang dapat membunuh bakteri. Bahan kimia terkadang dapat menimbulkan efek samping dan menyebabkan bakteri resisten terhadap bahan

antibakteri atau antimikroba tertentu. Terbatasnya bahan antibakteri yang sudah diketahui juga masih menjadi masalah dalam dunia kesehatan saat ini (Pastra dkk., 2012).

Spons adalah salah satu fauna laut yang banyak memiliki senyawa bioaktif unik. Senyawa aktif seperti enzim yang diisolasi dalam spons juga ditemukan dalam bakteri simbion spons, oleh sebab itu beberapa peneliti berpendapat bahwa

bakteri terlibat dalam biosintesa senyawa aktif tertentu dalam spons. Adanya hubungan antara produksi senyawa aktif oleh mikroba simbiosis dengan spons telah diteliti oleh Narsinha dan Anil (2000), yang melaporkan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis spons (*proteobacterium* MBIC 3368, *Idiomarina* sp, dan *Pseudomonas* sp) sangat dipengaruhi oleh protein rekombinan yang terikat dan terdapat pada biota inang *Suberites domuncula* (Murniasih dan Rasyid, 2010).

Salah satu senyawa-senyawa bioaktif unik yang dihasilkan oleh spons adalah protein aktif (enzim) yang dihasilkan dari mikroba simbiosis spons yang memiliki aktivitas farmakologis seperti antimikroba. Namun sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi senyawa metabolit sekunder terutama enzim dari bakteri simbiosis spons yang berpotensi sebagai bahan baku obat dalam menekan berbagai penyakit pada manusia seperti zat antimikroba (Suriani dkk., 2012).

L-Glutaminase (*L-Glutamine amidohydrolase*, EC.3.1.1.2) adalah enzim yang menghidrolisis L-Glutamin menjadi asam L-Glutamat dan melepaskan amonia (Sivakumar dkk., 2006). L-Glutaminase diusulkan sebagai enzim terapi. Beberapa penelitian yang dilakukan sebelumnya melaporkan bahwa bakteri jenis *Bacillus* dan *Pseudomonas* mampu menghasilkan L-Glutaminase.

Karakterisasi L-Glutaminase dari bakteri laut telah dilaporkan oleh Padma dan Singhal (2009) dan Yulianti dkk. (2012). Namun informasi mengenai L-Glutaminase yang diisolasi dari bakteri simbiosis biota laut (spons) dan aktivitas antimikrobanya dari perairan Indonesia sangat jarang. Oleh karena itu, dilakukan penelitian isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif yaitu enzim L-Glutaminase yang berasal dari mikroba simbiosis spons yang berpotensi sebagai bahan antimikroba.

B. METODE PENELITIAN

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel spons yang berasal dari Perairan Pulau Barang Lombo Sulawesi Selatan, biakan murni bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus*, media *Nutrien Broth* (NB), media *Nutrient Agar* (NA) media Muller Hilton Agar (MHA), 20 g/L bakto agar, 3 g/L pepton, 5 g/L L-glutamin p.a, 0,75 g/L KH_2PO_4 p.a, 0,8 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a, 0,15 g/L NaCl p.a, 1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a, klorampenikol, reagen Nessler, BSA (*Bovine serum albumin*), dan kertas pH universal.

2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *sentrifuse*, spektrometri 20D+, neraca analitik, *hotplate*, *magnetic stirrer*, *shaker*, inkubator, autoklaf, pH meter, enkas, vortex, dan alat gelas lainnya yang umum di laboratorium.

3. Prosedur Penelitian

Isolasi Bakteri Penghasil L-Glutaminase dari Spons

Sebanyak 15 gram sampel spons dibilas dengan 30 mL air laut steril. Kemudian air bilasan dimasukkan ke dalam 30 mL media NB lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam. Sedangkan bagian utuh spons dihaluskan menggunakan blender dan dimasukkan ke dalam 20 mL media NB lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam. Sampel yang telah disegarkan pada media NB diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Setelah itu masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam 20 mL medium cair pertumbuhan. Sampel selanjutnya diinokulasikan dalam cawan petri sebanyak 50 μL secara aseptik dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1-3 hari. Produksi L-Glutaminase oleh bakteri akan melepaskan amoniak sehingga meningkatkan pH medium pembiakan. Perubahan pH

membentuk warna merah muda dan diameter zona merah muda di sekitar koloni yang memproduksi L-Glutaminase.

Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Seleksi isolat yang menghasilkan senyawa antimikroba dilakukan secara kualitatif, dengan menggunakan *paper disc* yang sebelumnya telah digores atau ditotolkan bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aerus*) pada permukaan media yang mengandung isolat bakteri murni. Selanjutnya diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang menghasilkan senyawa antimikroba ditandai dengan adanya zona bening.

Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Isolat yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar diidentifikasi. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram dan pengujian biokimia.

Penentuan Waktu Produksi Optimum L-Glutaminase

Penentuan waktu produksi optimum dilakukan pada proses fermentasi dalam medium yang mengandung L-Glutamin sebagai substrat. Suspensi bakteri di *shaker* pada suhu 37 °C selama 1-5 hari dan setiap 12 jam dilakukan *sampling* untuk pengukuran OD pada panjang gelombang 660 nm dan kemudian diukur aktivitas L-Glutaminase yang dihasilkan serta ditentukan kadar proteinnya.

Fraksinasi dan Dialisis Ekstrak Kasar L-Glutaminase

Ekstrak Kasar difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing: 0-40 %, 40-60 %, dan 60-80 %. Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah buffer B dan selanjutnya didialisis dalam sejumlah buffer C. Masing-masing fraksi protein tersebut dimasukkan dalam kantong selofan. Selofan yang telah diisi dengan fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C lalu

diaduk dengan *magnetic stirrer*. Dialisis terus dilakukan sampai larutan buffer tidak berwarna lagi.

Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein diukur dengan menggunakan metode Lowry dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai larutan standar.

Pengukuran Aktivitas L-Glutaminase

L-Glutaminase yang diproduksi pada fermentasi yang mengubah L-Glutamin menjadi asam L-Glutamat dan melepaskan amoniak. Amoniak ini kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan reagen Nessler. Campuran reaksi terdiri dari 0.05 mL ekstrak kasar enzim, 0.85 mL L-Glutamin 0,03 M, 0.1 mL buffer tris-Cl 0.1 M pH 8, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi selanjutnya ditambahkan 0.25 mL TCA 1.5 M. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit. Setelah disentrifuge, 0.25 mL supernatan diencerkan hingga 4,25 mL menggunakan akuabides kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Nessler. Amonia yang dilepaskan oleh hidrolisis enzim L-Glutaminase bereaksi dengan reagen Nessler. Lalu ditentukan kadarnya menggunakan standar amonium klorida pada. Satu unit L-Glutaminase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan atau mengkatalisis 1,0 µmol amoniak per menit pada kondisi pengujian.

Karakterisasi L-Glutaminase

Pengaruh Konsentrasi Substrat

Penentuan konsentrasi substrat L-Glutamin optimum dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat L-Glutamin yaitu 0,005 µg/mL; 0,010 µg/mL; 0,015 µg/mL; 0,020 µg/mL; dan 0,025 µg/mL.

Pengaruh pH

Aktivitas L-Glutaminase dievaluasi pada pH yang beragam. Penentuan pH optimal dilakukan dengan menginkubasi ekstrak kasar enzim

menggunakan larutan buffer fosfat dan buffer tris-Cl berkisar 6-10.

Pengaruh Suhu

Aktivitas L-Glutaminase dievaluasi pada temperatur yang beragam pada pH optimum. Ekstrak kasar enzim diinkubasi pada rentang temperatur 30, 35, 37, 40, 45, dan 50 °C.

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode penapisan difusi agar *paper disc* ukuran 6 mm. Sebanyak 15 µL sampel, kontrol (+), dan kontrol (-) ditetaskan di atas *paper disc* 6 mm, kemudian diletakkan di atas permukaan media MHA yang sebelumnya sudah diinokulasi bakteri bioindikator (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*). Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 24-48 jam lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan mistar geser. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar *paper disc*, untuk membandingkan aktivitas antimikroba dari sampel digunakan klorampenikol sebagai kontrol positif dan bovine serum albumin sebagai kontrol negatif.

4. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Bakteri Penghasil L-Glutaminase dari Spons

Hasil inokulasi dengan metode agar tuang sangat bervariasi pada setiap pengenceran setelah pengamatan selama 3 hari. Koloni bakteri hasil inokulasi pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} baik dari air bilasan spons dan spons sangat padat dan berbentuk gerombolan, yang paling ideal untuk mewakili adalah hasil inokulasi pada pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} karena tidak begitu padat dan bentuk koloninya berbentuk tunggal besar. Menurut Lay (1994) jumlah koloni pada cawan petri yang representatif untuk menggambarkan jumlah dan komposisi sel bakteri pada sampel cair dengan teknik agar tuang adalah 30 sampai 300 koloni.

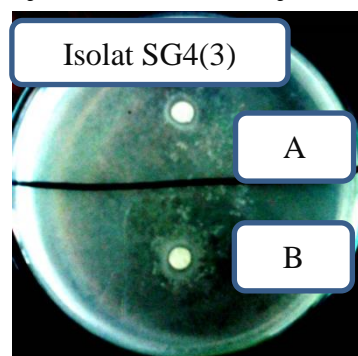
Bakteri simbiosis spons yang dapat menghasilkan enzim L-Glutaminase dapat diketahui dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada media padat pertumbuhan bakteri, dimana produksi L-Glutaminase oleh bakteri akan melepaskan amoniak sehingga meningkatkan pH medium. Perubahan pH membentuk warna merah muda pada media yang sebelumnya berwarna kuning dan diameter zona merah muda di sekitar koloni yang memproduksi L-Glutaminase.

Dari hasil yang diperoleh sebanyak 8 isolat bakteri simbiosis spons penghasil L-Glutaminase yang memiliki aktivitas pertumbuhan yang baik sehingga kedelapan isolat inilah yang digunakan untuk tahap selanjutnya.

Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Dari hasil uji daya hambat isolat bakteri terhadap bakteri uji (*E. coli* dan *S. aureus*) diperoleh hasil bahwa masing-masing isolat memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc*.

Berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk dari kedelapan isolat ternyata yang menghasilkan zona bening yang terbesar yaitu isolat SG4(3) sebesar 12,3 mm selama 24 jam dan 14,3 mm selama 48 jam untuk bakteri uji *S. aureus* dan 9,3 mm selama 24 jam dan 10,5 mm selama 48 jam untuk bakteri uji *E. coli*.



Gambar 1. Hasil uji daya hambat isolat bakteri simbiosis terhadap *E. coli* (B) dan *S. aureus* (A)

Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Karakteristik dari isolat SG4(3) yang menghasilkan aktivitas antimikroba terbesar terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Isolat SG4(3)

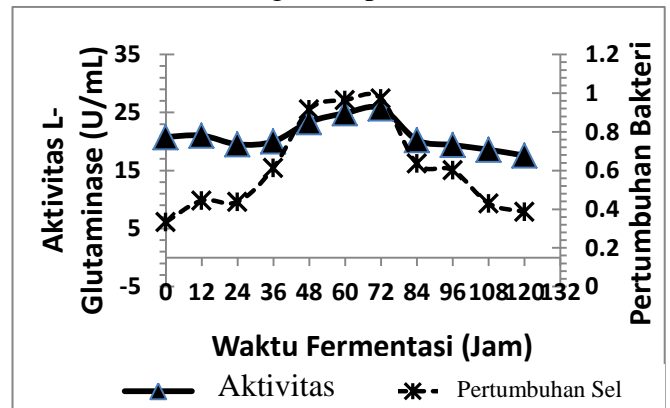
Pengujian		Hasil
Pewarnaan Gram	Bentuk	Basil (Batang) kokoh
	Gram	Negatif
TSIA	Slant	+ (Acid)
	Butt	+ (Acid)
	H ₂ S	-
	Gas	+
SIM	Indol	-
	Motility	-
	H ₂ S	-
MR-VP	MR	+
	VP	-
Sitrat		+
Urea		+
Uji Gula-gula	Glukosa	+
	Laktosa	+
	Sukrosa	+
	Mannitol	+

Berdasarkan beberapa pengujian yang telah dilakukan baik pewarnaan Gram dan uji biokimia sederhana serta didukung oleh ciri morfologi dan fisiologi, isolat SG4(3) yang diisolasi dari spons menunjukkan karakteristik yang mirip pada bakteri *Klebsiella spp*, oleh karena itu isolat bakteri simbiosis SG4(3) selanjutnya diberi nama *Klebsiella spp* SG4(3).

Penentuan Waktu Produksi Optimum L-Glutaminase

Aktivitas L-Glutaminase menunjukkan peningkatan seiring dengan lamanya waktu fermentasi dan jumlah bakteri dalam media. Pada jam ke-0 sampai jam ke-72, jumlah L-Glutaminase yang diperlukan untuk mengkatalisis 1 μ mol amoniak per menit mengalami peningkatan. Pada jam ke-72 aktivitas enzim yang diperoleh merupakan aktivitas tertinggi, dimana

aktivitas enzim yang didapatkan yaitu sebesar 35,83 U/mL. Pada jam ke-84 sampai jam ke-120, aktivitas enzim mengalami penurunan.



Gambar 2. Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Aktivitas L-Glutaminase Aktivitas L-Glutaminase yang diproduksi oleh bakteri *Klebsiella spp* SG4(3)

Hasil pada Gambar 2 diketahui bahwa pada jam ke-72 didapatkan aktivitas tertinggi oleh karena itu, waktu produksi yang digunakan untuk tahap produksi enzim yaitu selama 72 jam.

Fraksinasi dan Dialisis Ekstrak Kasar L-Glutaminase

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan perbedaan kelarutannya di dalam air. Penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi pada setiap tingkat fraksi, menyebabkan jenis protein yang mengendap pada tiap fraksi berbeda. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa setiap jenis protein memiliki kelarutan yang berbeda dalam air sehingga penambahan garam dengan kejenuhan tertentu dapat menyebabkan terjadinya pengendapan protein tertentu dengan tidak mengendapkan protein yang lainnya (Poedjiadi, 1994).

Dialisis bertujuan untuk menghilangkan senyawa kecil dan kelebihan garam amonium sulfat yang turut mengendap bersama dengan protein (Lehninger, 1993).

Adapun aktivitas L-Glutaminase yang diperoleh dari ekstrak kasar dan masing-masing fraksi dan kadar protein serta aktivitas spesifiknya terdapat dalam Tabel 2.

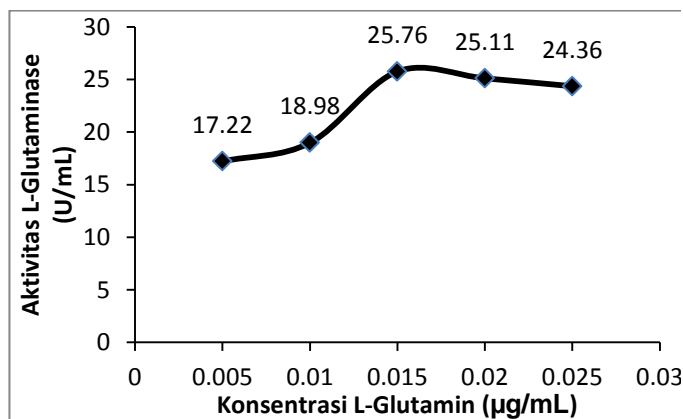
Tabel 2. Data Pengukuran Aktivitas L-Glutaminase masing-masing Fraksi dan Ekstrak Kasar

No	Sampel	Akt. L-Glutaminase (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Akt. Spesifik (U/mg)
1	EK	47,57	0,12	396,42
2	F1	15,87	0,07	226,71
3	F2	17,68	0,09	196,44
4	F3	18,71	0,01	1871

Tabel 2 menunjukkan aktivitas spesifik L-Glutaminase yang didapatkan dari ekstrak kasar dan masing-masing hasil fraksinasi serta dialisis berbeda-beda. Aktivitas spesifik L-Glutaminase didapatkan dengan membandingkan aktivitas yang di dapatkan terhadap kadar proteinnya. Dari Gambar 3, fraksi 60-80 % (F3) memiliki aktivitas spesifik tertinggi.

Karakterisasi L-Glutaminase

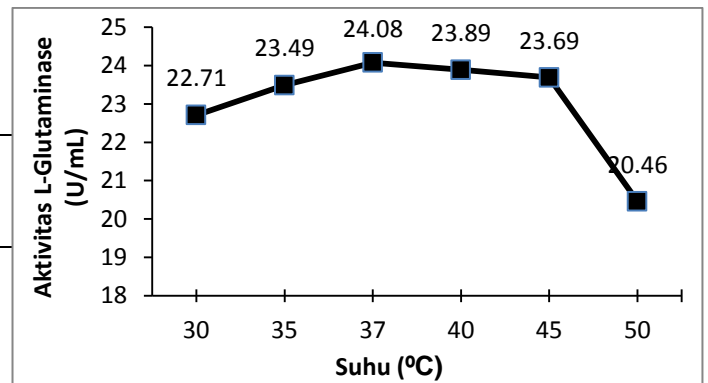
Pengaruh Konsentrasi Substrat



Gambar 3. Grafik Aktivitas L-Glutaminase pada Penentuan Konsentrasi Substrat L-Glutamin Optimum pada Kondisi Suhu 37 °C, pH 8,0, dan Waktu Inkubasi 30 menit.

Hasil uji aktivitas pada Gambar 3 dapat diketahui bahwa pada konsentrasi substrat L-Glutamin sebesar 0,015 µg/mL dengan waktu produksi 72 jam didapatkan aktivitas L-Glutaminase tertinggi.

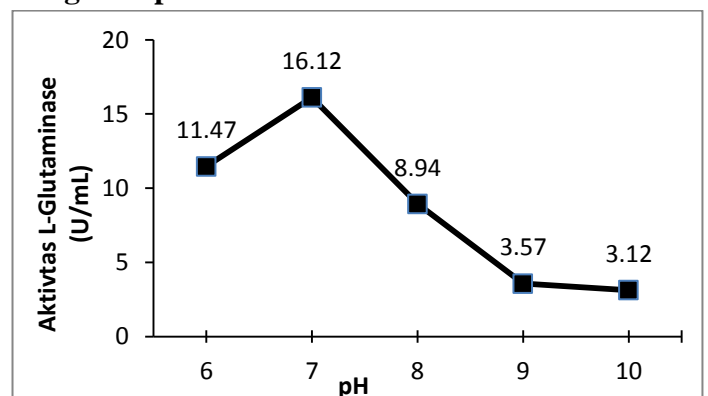
Pengaruh Suhu Inkubasi



Gambar 4. Grafik Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-Glutaminase pada [S] yaitu 15 g/L dan pH 8,0, dan Waktu inkubasi 30 Menit.

Berdasarkan hasil pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa suhu inkubasi optimum L-Glutaminase yaitu pada suhu 37 °C dengan menghasilkan aktivitas tertinggi sebesar 24,03 U/mL.

Pengaruh pH



Gambar 6. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-Glutaminase pada Kondisi Suhu 37 °C, [S] yaitu 15 g/L, dan Waktu Inkubasi 30 menit.

Berdasarkan grafik pada Gambar 6 dapat diketahui bahwa pH optimum L-Glutaminase yaitu pada pH 7 dengan menghasilkan aktivitas tertinggi sebesar 16,12 U/mL.

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Hasil Pengukuran diameter paper disc dan zona hambatan dari ekstrak kasar dan hasil fraksinasi serta dialisis L-Glutaminase dari bakteri

Klebsiella spp DG4(3) dapat dilihat dalam Tabel 3:

Tabel 3. Data Pengukuran Zona Hambatan L-Glutaminase Hasil Fraksinasi dan Dialisis serta Ekstrak Kasarnya

Sampel	Diameter Hambatan (mm)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
F1	6	6	6	6
F2	11,8	10,8	8,6	6,4
F3	7,4	6,7	8,1	6,2
Kontrol (+)	21	21	21	21
Kontrol (-)	6	6	6	6

Menurut David dan Stout, kriteria kekuatan daya antimikroba dikategorikan lemah bila menunjukkan zona hambat dengan diameter ≤ 5 mm, dikatakan sedang bila menunjukkan zona hambat dengan diameter 5-10 mm, dikatakan kuat bila menunjukkan zona hambat dengan diameter 10-20 mm, dan dikatakan sangat kuat bila menunjukkan zona hambat dengan diameter ≥ 20 mm. Berdasarkan data yang diperoleh dari Tabel 3 fraksi 40-60 % memiliki aktivitas antimikroba terbesar dengan kriteria sedang terhadap bakteri uji *E.coli* dan kuat terhadap bakteri uji *S. aureus*.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa setelah waktu inkubasi 2 x 24 jam, ukuran diameter masing-masing zona bening dari fraksi-fraksi yang aktif mengalami penurunan. Hal ini berarti bahwa L-Glutaminase yang terkandung dalam masing-masing fraksi bersifat bakteristatik, yaitu senyawa antimikroba yang hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen tetapi tidak mampu untuk mematikannya. Menurut Wattimena (1991), suatu antimikroba dikatakan bakteristatik jika antimikroba tersebut berkhasiat untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji dan

tidak mematikan kuman hingga dalam waktu 48 jam daerah hambatan kembali ditumbuhi bakteri.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan:

- Isolat yang menghasilkan L-Glutaminase berasal dari isolat bakteri simbiosis spons dan mempunyai ciri-ciri yang mengarah pada jenis bakteri Gram negatif, yaitu *Klebsiella spp*.
- Waktu produksi optimum L-Glutaminase yaitu pada jam ke-72, dengan menghasilkan aktivitas enzim sebesar 25,74 U/mL dan kadar protein sebesar 0,91 mg/mL.
- L-Glutaminase menghasilkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat L-Glutamin 0,015 $\mu\text{g/mL}$, pada suhu inkubasi 37 °C dan pada pH 7 sebesar 25,76 U/mL.
- Aktivitas antimikroba terbesar dari L-Glutaminase setelah waktu inkubasi 48 jam terdapat pada fraksi 40-60 % terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 10,8 mm (kategori kuat) dan terhadap *Escherichia coli* sebesar 6,4 mm (kategori sedang)

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, N.A, Amer, S.K, and Habeeb, M.K., 2013. Production, Purification and Characterization of L-Glutaminase Enzyme from *Streptomyces avermitilis*. *African Journal of Microbiology Research*, **7** (14), 1184-1190.
- Abubakar, H., Wahyudi, A.T., dan Yuhana, M., 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. *Jurnal Ilmu Kelautan*, **16** (1), 35-40.
- Amir, I., dan Budiyo, A., 1996. Mengenal Spons Laut (*Demospongiae*) Secara Umum. *Oseana*, **21** (2), 15-31.
- Arifuddin, Patong, R., dan Ahmad, A., 2001. Penelusuran Protein Bioaktif dalam Makro Alga sebagai Bahan Antibakteri dan Antijamur. *Marina Chimica Acta*, **2** (2), 11-18.

- 5) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013, *Riset Kesehatan Dasar*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- 6) Balia, R. L., 2014, Produksi dan Aplikasi Senyawa Antimikroba Asal *Saccharomycopsis fibuligera* Strain R64 sebagai Biopreservasi Ramah Lingkungan, *Indonesian Food Technologists*, **3** (1); 21-25.
- 7) Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Stephen, A. M., 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta.
- 8) Cappuccino, J. G., dan Sherman, N., 1992, *Microbiology a Laboratory Manual*, Rockland Community College, Suffern, New York.
- 9) Chandrasekaran, M., dan Nagendraprabhu, 1997. Industrial Enzyme from Marine Microorganisms-Indian Scenario. *Journal Marine Biotechnology*, **5**, 86-90.
- 10) Desmond, K.O., 1997. The Role of Microorganisms in Soy Sauce Production, *Advances in Applied Microbiology*. **45**, 427-433.
- 11) Dwidjoseputro, D., 2005, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Penerbit Djambatan, Jakarta.
- 12) Elshafei, A.M., Hasan, M.M., Ali, N.H., Mohammed Abd-Elmontasr Abouzeid, Mahmoud, D.A., dan Elghonemy, D.H., 2014. Purification, Kinetic Properties and Antitumor Activity of L-Glutaminase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. *British Microbiology Research Journal*, **4** (1), 97-115.
- 13) Hotmatua, A., 2004. Potensi Antimikroba Oligomer Kitosan yang dihasilkan dengan Menggunakan Enzim Termotabil *Kitosanase* LH 28.38. Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- 14) Huda, C., Salni, dan Melki, 2011. Penapisan Aktivitas Antibakteri dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak *Sarcophyton* sp. *Maspari Journal*, **4**(1), 69-76.
- 15) Imada, A., Igarasi, S., Hakahama, K., dan Isono, M., 1973. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-Organism. *Journal of General Microbiology*, **76**, 85-99.
- 16) Ismet, M.S., Soedharma, D., dan Effendi, H., 2011. Morfologi dan Biomassa Sel Spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia* sp. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, **3** (2), 153-161.
- 17) Iyer, P., dan Rekha, S.S., 2008. Production of Glutaminase (E.C.3.2.5.1) from *Zygosaccharomyces rouxii*: Statistical Optimization Using Response Surface Methodology. *Bioresource Technol.*, **99**, 4300-4307.
- 18) Iyer, P., dan Rekha, S. S., 2009. Screening and Selection of Marine Isolate for L-Glutaminase Production and Media Optimization Using Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry Biotechnology*, **159**, 233-250.
- 19) Kiruthika dan Saraswathy, 2013. Selective Isolation and Molecular Identification of L-Glutaminase Producing Bacteria from Marine Sediments. *Research Journal of Biotechnology*, **8** (8), 64-69.
- 20) Kusmiati dan Malik, A., 2002, Aktivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* PbAc1 pada Berbagai Media, *Seri Kesehatan (Health Series)*, **6** (1).
- 21) Lehninger, 1993, *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*, diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaja, Erlangga, Jakarta.
- 22) Liana, I., 2010, *Aktivitas Antimikroba Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Senggani (Melastoma candidum D.Don) terhadap Staphylococcus aureus dan Salmonella typhimurium serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi teraktif*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- 23) Limbu, E. N., 2013. *Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Amilase pada Mikroba Termofilik dari Sumber Air Panas Makula Tana Toraja Sulawesi Selatan*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- 24) Murniasih, T., dan Rasyid, A., 2010. Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal

- Barrang Lompo (Makassar) sebagai Sumber Bahan AntiBakteri. *Oseanologi dan Limnologi Indonesia*, **36** (3), 281-292.
- 25) Nandakumar, R., Yoshimune, K., Wakayama, M., dan Moriguchi, M., 2003. Review: Microbial Glutaminase; Biochemistry, Molecular Approaches and Application in Food Industry. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **23**, 87-100.
 - 26) Narsiha, L.T., dan Anil, A.C., 2000. Antibacterial Activity of The Sponge *Ircinia ramose*; Importance of Its Surface-Associated Bacteria. *Journal of Chemical Ecology*, **26** (1), 57-71.
 - 27) Nathiya, K., Nath, S.S., Angayarkanni, J., dan Palaniswamy, M., 2011. Screening of A High Glutaminolytic Enzyme Producing Strain and Its Extracellular Production by Solid State Fermentation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2** (3), 297-302.
 - 28) Pallem, C., Manipati, S., dan Somalanka, S.R., 2010. Process Optimization of L-Glutaminase Production by *Trichoderma koningii* Under Solid State Fermentation (SSF). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, **1** (3), 1168-1174.
 - 29) Pastra, D.A., Melki, dan Surbakti, H., 2012. Penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina sp* sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung. *Maspari Journal*, **4** (1), 77-82.
 - 30) Patta, A.M., Ahmad, A., dan Natsir H., 2013. *Produksi, Pemurnian Parsial, dan Karakterisasi L-Asparaginase dari Bakteri Termofilik Bacillus licheniformis Strain HSA3-1a*. Thesis tidak diterbitkan, Magister Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.
 - 31) Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
 - 32) Prakash, P.J.E., Poorani, P., Anantharaman, dan Balasubramaniam, T., 2009. L-Glutaminase Production and The Growth of Marine Bacteria. *Research Journal of Microbiol.*, **4**, 168-172.
 - 33) Pratiwi, D., 2013. *Kandungan Metabolit Sekunder yang Berpotensi Sebagai Antibakteri dari Bakteri Endofit Akar Vetiveria zizanioides*. Skripsi tidak diterbitkan, Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.
 - 34) Rahmat, R., 2007, Spons Indonesia Kawasan Timur; Keragaman, Distribusi, Kelimpahan, dan Kandungan Metabolit Sekundernya, *Oseanologi dan Limnologi Indonesia*, **33**, 123-138.
 - 35) Reha, W., Noor, A., Ahmad, A., La Nafie, N., dan Salama D., 2013. Karakterisasi Protein Aktif dari Spons dan Mikroba Simbionnya sebagai Usaha Awal Menuju Agen Immunostimulan. *Marina Chimica Acta*, **14** (1), 1-11.
 - 36) Roberts, J., Holcenberg, J.S., dan Dolowy, W.C., 1970. Antineoplastic Activity of Highly Purified Bacterial Glutaminase. *Nature*, **227**, 1136-1137.
 - 37) Rokhman, F., 2007, *Aktivitas Antibakteri Filtrat Bunga Teleng (Clitoria ternatea L.) terhadap Bakteri Penyebab Konjungtivitis*, Skripsi tidak diterbitkan, Program Studi Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
 - 38) Sabu, 1999. *L-Glutaminase Production by Marine Fungi*. Thesis Submitted, Departement of Biotechnology, Faculty of Science, Cochin University of Science and Technology.
 - 39) Sartika, 2014, *Potensi Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Alga Coklat Sargassum sp Asal Perairan Pulau Lae-Lae*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.
 - 40) Satish, 2011. Review of Literature of L-Glutaminase, (online), (<http://shodghanga.inflibnet.ac/>, diakses pada 9 Desember 2013).
 - 41) Sayed, A.S.A., 2009. L-Glutaminase Production by *Trichoderma koningii* Under Solid State Fermentation. *Indian Journal Microbiol.*, **49**, 243-250.
 - 42) Sivakumar, K., Sahu, M.K., Manivel P.R., dan Kannan, L., 2006. Optimum Conditions for L-Glutaminase Production by Actinomycetes Strain Isolated from Estuarine

Fish *Chanos chanos*. *Indian Journal of Experimental Biology*, **44**, 256-258.

- 43) Suparno, 2005. *Kajian Bioaktif Spons Laut (Porifera : Demospongiae) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Bidang Farmasi*. Makalah Pribadi Falsafah Sains, Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- 44) Suriani, Usman, H., dan Ahmad, A., 2012. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Spons *Callyspongia* sp., *Marina Chimica Acta*, **12** (1), 2-7.
- 45) Taylor, M.W., et al, 2007. Sponge-Associated Microorganism; Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71** (2), 295-347.
- 46) Warsidah dan Kartika E., 2013. Pengujian Aktivitas Sitotoksik dan Penentuan Spesies Bakteri Simbion Spons *Haliclona* sp., *Marina Chimica Acta*, **14** (1), 1-9.
- 47) Yulianti, T., Chasanah E., dan Tambunan, U.S.F., 2012. Screening and Characterization of L-Glutaminase Produced by Bacteri Isolated from Sangihe Talaud Sea. *Squalen*, **7** (3), 115-121.